

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 24520091152976

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

**TGF- β 1 通过 p38 MAPK 信号通路促进三
阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 迁移及
VEGF-D 的表达**

**TGF- β 1 promotes triple negative breast cancer cells MDA
-MB- 231 migration and the expression of VEGF-D through
the p38 MAPK signaling pathway**

刘 靖

指导教师姓名: 彭珍山 许林教授

专 业 名 称: 外 科 学

论文提交日期: 2012 年 4 月

论文答辩时间: 2012 年 5 月

学位授予日期: 2012 年 6 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 4 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

背景及目的

淋巴道转移早是三阴性乳腺癌预后极差的一个重要原因,其早期发生淋巴道转移高达 50%以上。研究证实,癌细胞向淋巴管的侵袭转移除了与癌细胞的侵袭迁移能力相关外,还涉及到癌组织中淋巴管的新生。目前大多数研究认为 VEGF-D 是特异性的淋巴管生成因子,它与 VEGFR-3 结合可导致 VEGFR-3 胞内区酪氨酸磷酸化,触发丝裂原蛋白激酶(MAPK)级联反应,启动转录,引起淋巴内皮细胞分裂、增殖,从而导致淋巴管的生成。近年来众多研究证实 TGF- β 1 与肿瘤的发生、进展和转移密切相关。但关于 TGF- β 1 对三阴性乳腺癌淋巴道转移的影响及其机制研究的较少。目前又有多项体外研究证实, p38 MAPK 信号通路在癌细胞的侵袭转移过程中发挥着重要作用。那么,它们之间究竟有没有关系,是什么样的关系?需要我们不断地研究予以解答。

本实验应用人三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231,在细胞水平探究 TGF- β 1 能否增强 MDA-MB-231 的迁移能力,以及能否上调 VEGF-D 的表达从而促进三阴性乳腺癌淋巴道转移。并在此基础上,探讨 p38 MAPK 信号通路是否参与其中。

方法

MTT 比色法检测 TGF- β 1 对三阴性乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 增殖的影响。并探求 TGF- β 1 调控其增殖的浓度效应和时间效应。划痕实验检测 TGF- β 1 对 MDA-MB-231 迁移能力的影响,同时探讨该过程与 p38 MAPK 信号通路的相关性。利用 Western Blot 和 ELISA 检测 TGF- β 1 对 MDA-MB-231 细胞 VEGF-D 表达的影响,并探究该过程是否与 p38 MAPK 信号通路相关。

结果

低浓度 TGF- β 1 (5.0ng/ml) 对 MDA-MB-231 细胞的增殖有一定的抑制作用。随着剂量的增加和时间的延长,这种抑制作用变得不明显。划痕实验显示不同浓度 TGF- β 1 作用 MDA-MB-231 细胞 24h,细胞的迁移能力均明显增强;而预先应

用 p38 特异性抑制剂阻断 p38 MAPK 信号通路后,发现 TGF- β 1 促进 MDA-MB-231 细胞迁移的作用被明显抑制。Western Blot 和 ELISA 共同证实 TGF- β 1 能够促进 MDA-MB-231 细胞分泌 VEGF-D;而预先应用 p38 特异性抑制剂阻断 p38 MAPK 信号通路,TGF- β 1 上调 VEGF-D 的作用受到明显抑制。

结论

1. TGF- β 1 对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖有一定的抑制作用。随着剂量的增加和时间的延长,这种抑制作用逐渐消失。

2. TGF- β 1 能够促进 MDA-MB-231 细胞的迁移,且该过程依赖于 p38 MAPK 信号通路。

3. TGF- β 1 能够上调 MDA-MB-231 细胞 VEGF-D 的表达,该过程与 p38 MAPK 信号通路密切相关。

关键词: p38; 三阴性乳腺癌; TGF- β 1; VEGF-D; 淋巴道转移

ABSTRACT

Background & objective

An important reason for poor prognosis of triple negative breast cancer is the early occurrence of lymph node metastasis, which is up to 50%. The study confirmed that the invasion and metastasis of cancer cells to lymphatic vessels not only related to cell migration, but also to the newborn of lymphatic vessels in cancer tissue. At present, most study confirmed that VEGF-D is a specific lymphatic endothelial growth factor, which combination with VEGFR-3 can lead to the tyrosine phosphorylation of VEGFR-3 intracellular, trigger mitogen protein kinase (MAPK) cascade reaction, initiate transcription, cause the division and proliferation of lymphatic endothelial cell, and then result in lymphangiogenesis. Study on the effect and mechanism of TGF- β 1 on lymph node metastasis of breast cancer and VEGF-D are less at this phase. In recent years, there are a number of studies in vitro confirmed that p38 MAPK signaling pathway plays an important role in cancer cell invasion and metastasis.

The experiments at the cellular level took triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 as research object, explored TGF- β 1 whether enhanced the migration ability of MDA-MB-231 cells, and whether increased the expression of VEGF-D, so as to promote the triple negative breast cancer lymph node metastasis. On this basis, we applied to p38 MAPK inhibitor to explore whether the p38 MAPK signaling pathway was involved in the process.

Methods

We employed MTT assay to detect the proliferation of triple negative breast cancer cell line MDA-MB-231 which treated with TGF- β 1, and explore the concentration effect and time effect of TGF- β 1 in regulation of proliferation. We used the scratch assay to detect migration changes of MDA-MB-231 cells processed with TGF- β 1, and explored whether the p38 MAPK signaling pathway participated in the

process. After treating MDA-MB-231 cells with TGF- β 1, we detected the changes of VEGF-D expression through Western Blot and ELISA, and explored whether the p38 MAPK signaling pathway played an important role in this process.

Results

During the research process, I was observing the phenomenon that low concentrations of TGF- β 1 (5.0ng/ml) to a certain extent inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells. But with the increase of dose and time, this inhibition is not obvious. Scratch test showed that the migration ability of MDA-MB-231 cells was significantly enhanced with different concentrations of TGF- β 1 treatment for 24 hours. However, pretreatment with p38 MAPK specific inhibitors to block the p38 pathway, the effect of promoting migration by TGF- β 1 was significantly inhibited. Western Blot and ELISA confirmed TGF- β 1 could upregulated VEGF-D production in MDA-MB-231 cells. While pretreatment p38 MAPK specific inhibitor to block the p38 pathway, we found that the increase of VEGF-D production was significantly inhibited.

Conclusions

- 1.Low concentrations of TGF- β 1 to a certain extent inhibited the proliferation of MDA-MB-231 cells. As the dose increases, this inhibition became not obvious.
- 2.TGF- β 1 could promote the migration of MDA-MB-231 cells. And the process is dependent on the p38 MAPK signaling pathway.
- 3.TGF- β 1 could upregulated VEGF-D production in MDA-MB-231 cells. The process is closely related to the p38 MAPK signaling pathway.

Key Words: p38; Triple negative breast cancer; TGF- β 1; VEGF-D; Lymphatic metastasis

中文摘要	I
英文摘要	III
缩略词表	VII
前 言.....	1
一.乳腺癌的病因	1
二.乳腺癌的治疗	4
三.TGF- β 1 与肿瘤转移的相关性.....	6
四.p38MAPK 与肿瘤侵袭转移的相关性.....	9
五.实验方案设计	11
第一章 TGF-B1 影响 MDA-MB-231 增殖、浸润转移的研究.....	13
一.材料和方法	13
二 结果与分析	19
三 讨论	23
第二章 TGF-B1 影响 MDA-MB-231 迁移的机制研究.....	25
一.材料和方法	25
二.结果与分析	32
三 讨论	36
第三章 TGF-B1 影响 MDA-MB-231 细胞 VEGF-D 表达的研究.....	38
一.材料和方法	38
二.结果与分析	45
三.讨论	49
总 结.....	51
参考文献	52
致谢.....	58

CONTENTS

ABSTRACT	I
ABBREVIATIONS TABLE	VII
INTRODUCTION	1
I.Etiology of breast cancer	1
II.The treatment of breast cancer	4
III.TGF- β 1 and tumor metastasis	6
IV.p38 MAPK and tumor metastasis	9
V .Experimental design.....	11
CHAPTER I The research about the affect of TGF-β1 in the proliferation and metastasis of MDA-MB-231 cells	13
I . Materials and Methods	13
II.Results and Analysis.....	19
III.Discussion	23
CHAPTER II the research about the mechanisms of TGF-β1 promoting the migration of MDA-MB-231 cells.....	25
I . Materials and Methods	25
II .Results and Analysis.....	32
III.Discussion	36
CHAPTER III The research about the affect of TGF-β1 in the expression of VEGF-D in MDA-MB-231 cells.....	38
I . Materials and Methods	38
II.Results and Analysis.....	45
III.Discussion	49
CONCLUSION	51
REFERENCES	52
ACKNOWLEDGMENTS.....	58

缩略词表

缩略词	英文全称	中文全称
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1	转化生长因子 β 1
VEGF-D	Vascular endothelial growth factor D	血管内皮生长因子 D
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor	血管内皮生长因子受体
ER	Estrogen receptor	雌激素受体
PR	Progesterone receptor	孕激素受体
HER2	Human epidermal growth factor receptor-2	人类表皮生长因子受体 2
TNBC	Triple negative breast cancer	三阴性乳腺癌
HBC	Hereditary breast cancer	遗传性乳腺癌
TGF- β R	Transforming growth factor- β receptor	TGF- β 受体
EMT	Epithelial-mesenchymal transition	上皮间质细胞转化
CTGF	Connective tissue growth factor	结缔组织生成因子
MMP	Matrix metalloproteinase	基质金属蛋白酶
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase	金属蛋白酶组织抑制剂
IL-11	Interleukin-11	白介素 11
PTHrP	Parathyroid hormone related protein	甲状旁腺激素相关蛋白
TSP1	Thrombospondin 1	凝血酶敏感蛋白 1
NF- κ B	Nuclear Factor-KappaB	核因子 κ B
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇-3 激酶
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶

厦门大学博士论文摘要库

前言

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤，其发病率逐年增高，发病年龄也趋于年轻化。据统计，全世界每年约有 120 万妇女患乳腺癌，50 万人死于乳腺癌^[1]。虽然目前我国的乳腺癌的发病率低于欧美国家，但是由于近些年饮食结构的改变、生育年龄的推迟、生活环境等因素的影响，我国已是乳腺癌发病率增长最快的国家之一。中国抗癌协会数据显示，我国乳腺癌发病率每年递增 3%，10 年间，中国主要大城市北京、上海、天津等地乳腺癌发病率增长了 37%，同时死亡率也增长了 38.9%。目前，乳腺癌是我国城市死亡率增长最快的癌症。

根据基因表达谱的聚类分析方法，乳腺癌可分为 luminalA 型（ER+/PR+，HER2-）、luminalB 型（ER+/PR+，HER2+）、HER2（ER-/PR-，HER2+）型以及三阴性乳腺癌（TNBC）^[2]。三阴性乳腺癌是乳腺癌的一个特殊类型，占乳腺癌全部类型的 17.3%^[3]。

随着医疗水平的不断提高，乳腺癌的综合治疗取得了重大突破。未发生转移的乳腺癌，绝大多数用手术和放疗可以治愈。但是乳腺癌一旦发生淋巴道或血道转移，即使积极治疗也仅能治愈小部分病人。而三阴性乳腺癌侵袭快，转移早；同时，由于其缺乏雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）和人表皮生长因子受体（HER2），无法应用现在较为成熟的内分泌治疗和 HER2 靶向治疗；化疗上又缺乏相应的药物和方案，目前正成为现代乳腺癌治疗的瓶颈。因此，研究肿瘤淋巴道转移的分子机制，可望为乳腺癌及其他肿瘤的靶向治疗及个体化治疗奠定基础。

一 乳腺癌的病因

目前，乳腺癌的发病原因并不完全明了。相关的影响因素有：

1. 年龄

女性随着年龄增长，乳腺癌发病率逐渐上升。月经初潮及 20 岁以前的乳腺癌很少见，但在 20 岁之后，其发病率上升迅速。到 45~50 岁阶段，稳定在一个

较高的水平，呈现一个平台期。随着绝经的开始，发病率继续上升，在 70 岁左右达到顶峰。乳腺癌的死亡率也随年龄的增加而上升，从 25 岁到开始，直到老年，死亡率一直处于上升趋势。

2.遗传因素

遗传因素是目前最为肯定的乳腺癌发病因素之一。所有乳腺癌病例中，遗传性乳腺癌（HBC）占 5%~10%。有研究显示，一级直系亲属患乳腺癌的女性，患乳腺癌的危险性高于普通人群的 2-3 倍。BRCA1 是一个重要的抑癌基因，其产物能够阻止细胞进入增殖周期，诱发细胞凋亡；它的表达下降、缺陷或缺失将大大增加了女性对乳腺癌的易感性。携带 BRCA1 突变基因者，一生患乳腺癌的危险性为 36%~87%。多数三阴性乳腺癌（TNBC）患者均存在 BRCA1 结构和功能的异常^[4]。

3.初潮年龄和绝经年龄

目前认为，初潮年龄过早（11 岁以前），绝经年龄过晚（55 岁以后）是罹患乳腺癌的可重复危险因素。当绝经年龄每延迟一年，患乳腺癌的危险性便增加 3%。同时，月经周期过短，患乳腺癌的几率也相对较高^[5]。

4.生育因素

初次全程妊娠年龄在 35 岁以上者，每增加 1 岁，患乳腺癌的危险性便增高约 5%；而后每增加 1 次生产，患病率降低约 7%。未育者及产次较低经产妇同样视为危险因素。研究认为：女性分娩间隔期短，其终生患乳腺癌的几率较低。

5.哺乳

爱斯基摩人平均哺乳时间超过 3 年，有的甚至长达 30 年，她们患乳腺癌的几率仅为 10 万分之一。这很好的证明了哺乳总时间越长，患乳腺癌的几率越小。不哺乳的母亲相对于哺乳者，其患乳腺癌的几率高 2~3 倍^[6]。

6.体重因素

女性绝经后，来自肾上腺和卵巢的雄烯二酮经芳香化酶作用后生成雌酮，之

后雌酮又可转化为雌二醇，二者的升高导致绝经后女性体重的增加，同时也增加了患乳腺癌的危险性^[7]。体重每增加 5 公斤，患乳腺癌的危险性升高 8%。

7.放射线

长期多次接受高水平电离辐射，尤其是因其他疾病而多次接受胸部照射的女性，乳腺癌发病率显著增加。有报道称：女性年龄越大，接受的辐射量越大，乳腺癌发病率越高。

8.精神、心理因素

研究表明，长期情绪压抑而得不到释放，精神刺激、创伤（家庭不幸、常受挫折等）或性格孤僻、抑郁等因素均能影响乳腺癌的发病。原因可能为长期受到精神刺激而引起持续的应激反应，当反应超过机体负荷，使免疫功能失调，导致肿瘤的发生，尤其是女性乳腺癌。有研究显示，经受过生活打击的女性患乳腺癌的几率相对增高 2~3 倍。

9.饮食结构

Cui 等^[8]学者研究认为：亚洲绝经后女性，好肉类-甜食者患乳腺癌的几率明显高于常吃蔬菜-大豆者。经常摄入富含维生素 A、C、D、E 及胡萝卜素的蔬菜、水果能减少患乳腺癌的危险性。

10.使用避孕药

有研究^[9]认为：在 25 岁以前口服避孕药达 6 年以上的女性，患乳腺癌的几率要比未曾用药者高 5 倍。原因可能是长期的雌孕激素周期性交替，引起雌激素代谢紊乱，从而引发乳腺癌。

11.环境因素

环境中存在的一些致癌物质如苯、1,3-丁二烯等有机溶剂，不完全燃烧产生的苯并芘，烤焦的鱼、肉中含有的杂环胺等都是乳腺癌的诱发剂。

12.其他

除此之外，致癌性 RNA 病毒的感染、吸烟等因素也与乳腺癌相关。

二 乳腺癌的治疗

1. 手术治疗

手术切除是治疗实体肿瘤的首选方式，乳腺癌也不例外。1894 年 Halsted 提出乳腺癌的转移按解剖部位顺次发展，即由原发灶转移至区域淋巴结，再发生血运转移；其提出的乳腺癌根治术一直是乳腺癌治疗的标准术式。切除范围包括整个乳房、胸大肌、胸小肌、腋窝和锁骨下淋巴结。但近 20 余来 Fisher 提出乳腺癌自发病即是一种全身性疾病。因而目前乳腺癌的治疗力求缩小手术范围，而加强术后辅助治疗。

1.1 乳腺癌改良根治术

乳腺癌改良根治术是常用的手术方式。目前有两种术式：一种是保留胸大、小肌；另一种是保留胸大肌，切除胸小肌。根据大量病例的随访，认为早期乳腺癌患者行改良根治术与根治术的生存率并无差异。但前者由于切除范围小，术后外观较好、恢复快，更易为患者接受。

1.2 保乳手术

手术范围包括肿块的完整切除及腋窝淋巴结清扫。主要适用于早期乳腺癌患者，且乳房需有足够体积，术后才能保持良好外观，否则将影响手术效果及乳房的美容效果。

1.3 前哨淋巴结活检

前哨淋巴结是乳腺癌引流的第一枚淋巴结。它的活检病理结果可预测腋淋巴结是否已有癌细胞转移。对于病检阴性的病人可不作腋淋巴结清扫，是乳腺癌手术治疗的一个重要进展。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库